

家蚕肽聚糖识别蛋白 L1 参与 Imd 信号通路

张 杨¹, 刘 霁¹, 杨 杰¹, 崔清清¹, 沈中元^{1,2}, 吴金美^{1,2,*}

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

摘要:【目的】肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRP)作为一个重要的模式识别受体,在家蚕 *Bombyx mori* 的先天免疫中发挥重要的作用。本研究主要探讨家蚕 *PGRP-L1* 基因的功能及其所参与的免疫信号通路。【方法】本实验通过 RT-PCR 扩增获得家蚕 *PGRP-L1* 基因。利用微生物诱导实验对 5 龄起蚕分别注射大肠杆菌 *Escherichia coli*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和 PBS, 12 h 后取体壁和头部提取 RNA, 然后采用 RT-PCR 和凝胶电泳技术测定 *BmPGRP-L1* 基因的表达水平; 利用 RNA 干涉实验向 5 龄起蚕注射 *PGRP-L1* dsRNA 或 PBS, 6 h 后再分别注射 3 种灭活的微生物或 PBS, 然后检测家蚕体壁及头部的免疫相关转录因子 (*Rel*, *Cactus* 和 *Relish*) 以及家蚕多个抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 基因 (攻击素基因 *Attacin*, *Moricin* 和葛佬素基因 *Gloverin*) 的表达情况。【结果】微生物诱导实验显示, 注射大肠杆菌的实验组比注射 PBS 的对照组 *BmPGRP-L1* 基因转录水平显著上调, 而注射酿酒酵母和枯草芽孢杆菌的实验组 *BmPGRP-L1* 转录水平没有变化。利用 RNAi 技术成功敲低 *BmPGRP-L1* 表达, 对 *BmPGRP-L1* 敲低的 5 龄起蚕注射灭活的微生物, 敲低实验组 *relish* 因子表达低于正常对照组, 相应地抗菌肽基因的表达也有不同程度的下调。【结论】结果提示, *BmPGRP-L1* 基因参与家蚕对革兰氏阴性菌大肠杆菌的免疫响应; *BmPGRP-L1* 基因在家蚕的体壁和头中参与 Imd 信号通路。

关键词: 家蚕; 先天免疫; 肽聚糖识别蛋白; 微生物诱导; RNA 干扰

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)02-164-08

Peptidoglycan recognition protein L1 is involved in the Imd pathway in the silkworm, *Bombyx mori*

ZHANG Yang¹, LIU Ji¹, YANG Jie¹, CUI Qing-Qing¹, SHEN Zhong-Yuan^{1,2}, WU Jin-Mei^{1,2,*}

(1. College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract: 【Aim】As an important pattern recognition receptor, peptidoglycan recognition protein (PGRP) plays an important role in the innate immunity of the silkworm, *Bombyx mori*. The study aims to identify and characterize a new PGRP gene *PGRP-L1* from *Bombyx mori*, analyze its immune function and the immune signaling pathway that the gene is involved in. 【Methods】We successfully cloned the gene *BmPGRP-L1* from *Bombyx mori* by RT-PCR. Newly-exuviated 5th instar larvae of *B. mori* were injected with *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* and phosphate buffered saline, respectively. After 12 h, the integument and head were collected and used for RNA extraction. RT-PCR and gel electrophoresis were then performed to measure the transcriptional level of *BmPGRP-L1* gene. Newly-exuviated 5th instar larvae were injected with dsRNA specific for *BmPGRP-L1* and PBS, respectively, then 6 h later injected with the inactivated three microorganisms and phosphate buffered

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272508)

作者简介: 张杨, 男, 1990 年 7 月生, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕天然免疫, E-mail: 437365534@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jwvus@hotmail.com

收稿日期 Received: 2015-10-24; 接受日期 Accepted: 2016-01-08

saline, and another 6 h later, tissues were collected and used to detect the transcription levels of related transcription factors (*Rel*, *Cactus* and *Relish*) and antimicrobial peptides (AMPs) genes (*Attacin*, *Moricin* and *Gloverin*). 【Results】 Microbial induction experiments showed that *BmPGRP-L1* mRNA level was upregulated in the integument and head of *B. mori* 12 h after injection of *E. coli* but presented no change after injection of *S. cerevisiae* or *B. subtilis*. RNA interference experiments showed that the expression level of *BmPGRP-L1* was successfully knocked down, and the expression level of *relish* in the newly-exuviated 5th instar larvae subjected to *BmPGRP-L1* RNAi was significantly lower than the normal control post *E. coli* challenge, and the corresponding expression levels of the relevant antimicrobial peptide genes were downregulated to different degrees. 【Conclusion】 The results suggest that *BmPGRP-L1* gene participates in the immune response of *B. mori* against gram negative bacteria *E. coli*, and *BmPGRP-L1* participates in the Imd signal transduction pathway in integument and head of *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; innate immunity; peptidoglycan recognition protein; microbial invasion; RNA interference

昆虫是地球上种类最多的一个物种,它们抵抗病原微生物入侵和感染的方式主要是通过其强有力的天然免疫系统。在分子水平上,它的防御策略被认为是高度保守的。昆虫的天然免疫反应包括细胞的吞噬、封装、凝固、形成结节,以及抗菌物质的产生以及黑化作用(Lemaitre and Hoffmann, 2007),也就是细胞免疫和体液免疫。随着鳞翅目(Lepidoptera)模式昆虫家蚕 *Bombyx mori* 基因组测序的完成,家蚕已经成为昆虫病理和遗传方面研究的一个模式生物(The International Silkworm Genome Consortium, 2008)。当家蚕受到病原微生物侵染时,首先会被模式识别受体所识别,接着引发激活丝氨酸蛋白酶和解除丝氨酸蛋白酶抑制剂的细胞外级联反应,从而将感染的信号放大;然后激活细胞内的信号转导途径,最后表达并分泌效应因子(Hoffmann, 2003)。

肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)是一种模式识别分子,可识别病原微生物的肽聚糖,被认为在昆虫的先天免疫中扮演着重要的角色(Takeda and Akira, 2005; Anselme *et al.*, 2006)。PGRPs 的主要功能是先天免疫反应的调节(Steiner, 2004),它可以调节酚氧化酶系统,激活 Toll 或 Imd 途径,并参与黑化反应和吞噬(Gottar *et al.*, 2002; Maillet *et al.*, 2008)。Yoshida 等(1996)分离纯化出第一个 PGRP,并认为它可以激活酚氧化酶原级联反应(prophenoloxidase cascade)。随后该蛋白的基因 cDNA 被克隆,并且被命名为 *BmPGRP-S1*(Ochiai and Ashida, 1999)。在昆虫中,根据预测的蛋白结构,PGRPs 可以分为短型 PGRPs (PGRP-S) 和长型 PGRPs (PGRP-L) (Leone *et al.*,

2008)。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 基因组包含 13 个 PGRP 基因,通过选择性剪接共编码的 19 种蛋白(Werner *et al.*, 2000)。同源性检测表明 PGRP 是与噬菌体 T7 溶菌酶同源的一个蛋白,其中 Cys-130 对于 N-乙酰胞壁酸-L-酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, NAMLAA)的活性是必不可少的(Gelius *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Mellroth *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003)。

Tanaka 等(2008)发现在家蚕基因组中有 12 个 PGRP 基因,其中 6 个属于短肽,主要是分泌蛋白,另外 6 个属于长肽,主要是跨膜或胞内蛋白,并认为它们的生物学功能不太一样(Guan *et al.*, 2004; Dziarski and Gupta, 2006)。近年来,家蚕短型 PGRP 的研究已取得一定的进展,如 S1(Yoshida *et al.*, 1996)、S2(Yang *et al.*, 2015)、S3(Gao *et al.*, 2014)、S5(Chen *et al.*, 2014)等基因的克隆以及功能已被研究,而长型 PGRP 基因尚未见报道。本研究选择家蚕中 PGRP-L1 基因来进行研究,拟探讨其功能和参与的免疫信号通路,为进一步研究家蚕 PGRP 家族的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试家蚕

所用家蚕品种为秋丰×白玉,由中国农业科学院蚕业研究所病理实验室提供,蚕卵在温度 25℃、相对湿度 80% 条件下进行催青,幼虫在室温(25℃)条件下桑叶饲育。大肠杆菌 *Escherichia coli*,酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 由江苏科技大学分子生物学实验室保存。

1.2 RNA 提取

按照 RNAiso™ Plus 试剂盒 (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd., 大连) 的使用说明提取 RNA, 步骤大致如下: (1) 家蚕组织 100 mg, 放于 1.5 mL 离心管中, 加 1 mL RNAiso™ Plus 后匀浆, 室温静置 5 min, 加入 200 μL 的氯仿, 振荡混匀, 12 000 g 4℃ 离心 15 min; (2) 吸取 400 μL 上清液, 转至新的离心管, 加入等体积的异丙醇, 充分混匀, 室温静置 10 min。然后 12 000 g 4℃ 离心 10 min; (3) 弃上清, 然后用 1 mL 75% 乙醇清洗沉淀, 12 000 g 4℃ 离心 5 min; (4) 室温干燥, 放置 5 min, 加 RNase-free H₂O 溶解。

1.3 BmPGRP-L1 ORF 的克隆

用 5 龄第 3 天的家蚕幼虫表皮提取 RNA (同 1.2 节), 根据 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻) (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd., 大连) 的使用说明来进行反转录反应。

选择上游引物 5'-TTGGACTAAGATGCCTAGACGG-3' 和下游引物 5'-TTAAGATACCATTCCGTAGG-3' 扩增 PGRP-L1 的 ORF。RT-PCR 扩增反应条件如下: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72 min 延伸 1 min, 30 个循环; 然后 72℃ 终延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 然后再用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 [Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., 上海] 回收纯化, 连接到 pMD-18T 载体上 (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd., 大连), 最后转化到大肠杆菌 DH10B, 送到生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.4 BmPGRP-L1 ORF 的序列和结构分析

用软件 MEGA5.1 对 BmPGRP-L1 序列进行系统发育分析。使用 SMART (<http://smart.ehbl-heidelberg.de/>) 和 Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) 对其蛋白的结构域进行分析。信号肽和跨膜结构域使用 TMHMM server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析。

1.5 微生物诱导的半定量 PCR

对 5 龄起蚕分别注射 5 μL 酿酒酵母 (3.5 × 10⁸ cells/mL)、枯草芽孢杆菌 (2 × 10⁵ cells/mL) 及大肠杆菌 (2.1 × 10⁸ cells/mL) 和 PBS, 取注射 12 h 后的表皮和头, 然后分别提取总 RNA (同 1.2 节) 进行半定量 PCR, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察 PGRP-L1 基因的表达。

1.6 RNA 干涉

根据 T7 RiboMAX Express System (Promega

Corp., Madison, WI) 试剂盒的说明书来合成所需要的 dsRNA。使用 5' 末端带有 T7 启动子序列的 L1-T7-F: GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGCAGG GTGATTAGAGCGTT, L1-R1: CCATTCCGTAGGTAA CTTTACA; L1-F: AGCAGGGTGATTAGAGCGTT, L1-T7-R1: GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCATTC CGTAGGTAAGT 来分别扩增 2 条互补的 BmPGRP-L1 的 ORF。PCR 扩增反应条件如下: 94℃ 预变性 3 min; 然后先 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72 min 延伸 1 min, 10 个循环; 再 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 终延伸 10 min。

选用 5 龄起蚕进行注射实验, 分为 4 个实验组和 4 个对照组, 每一组共注射 30 头家蚕。实验组每头幼虫先注射 5 μg BmPGRP-L1 特异的 dsRNA, 6 h 后分别注射 5 μL 失活的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母以及磷酸盐缓冲液 (PBS)。对照组先注射 5 μL 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 6 h 后注射相应的微生物或 PBS, 然后在 25℃ 条件下进行饲养。在微生物注射处理 6 h 后, 解剖取其表皮和头。分别提取 dsRNA + 酿酒酵母、dsRNA + 枯草芽孢杆菌及 dsRNA + 大肠杆菌或 dsRNA + PBS (无微生物注射对照), 以及无双链 RNA 注射作为对照的 PBS + 酿酒酵母、PBS + 枯草芽孢杆菌、PBS + 大肠杆菌及 PBS + PBS (无微生物注射对照) 进行处理的 RNA (同 1.2 节), 选用合适的引物然后进行 RT-PCR, 观察家蚕抗菌肽基因和转录因子的表达情况。所用到的相关抗菌肽及转录因子的引物如表 1 所示, 内参序列为 eTIF4A-F: TGCTGGGCACTCCAGGTCGT, eTIF4A-R: AGCCAATCCACCTTGCGACGG。

表 1 抗菌肽和转录因子基因引物序列
Table 1 Sequences of primers for genes of AMPs and transcription factors

引物 Primer name	寡核苷酸序列 (5' - 3') Oligonucleotide sequence
BmAttacin-F	GGCTCGCTCTAGACAACGTA
BmAttacin-R	ACATTGGGCTCCACGAAG
BmGloverin-F	TACTCGATCAGCGGGCAATC
BmGloverin-R	GACCATACCACCGGCAGAAA
BmMoricin-F	GCAAAAACAGTAAACCGCGCA
BmMoricin-R	CACAGTTGTCGTTGCAATCAAT
BmCactus-F	TAGGATGTTGTCATCGCCG
BmCactus-R	CAGACTCTCGTTGTCGCTGT
BmRel-F	CAGATGCGAACGATACCGGA
BmRel-R	TGGCTTGTGGAGAGCTTGTT
BmRelish-F	TACAAAGTCGGGCTTCGGTGG
BmRelish-R	TGAAACTCCCGTTAGCCGTC

2 结果

2.1 BmPGRP-L1 的核苷酸以及氨基酸序列

BmPGRP-L1 ORF 的 GenBank 登录号是 KT907183, 共有 915 bp, 编码 304 个氨基酸。

ProtParam 预测 BmPGRP-L1 蛋白分子质量为 34.39 kD, 等电点为 6.76。BmPGRP-L1 蛋白共有 3 个结构域: 跨膜区(第 76-98 位氨基酸), PGRP 结构域(第 120-260 位氨基酸; $E = 1.5e-35$) 和 Ami 2(第 135-272 位氨基酸; $E = 2.73e-10$) 结构域, 参与肽聚糖的分解代谢过程。

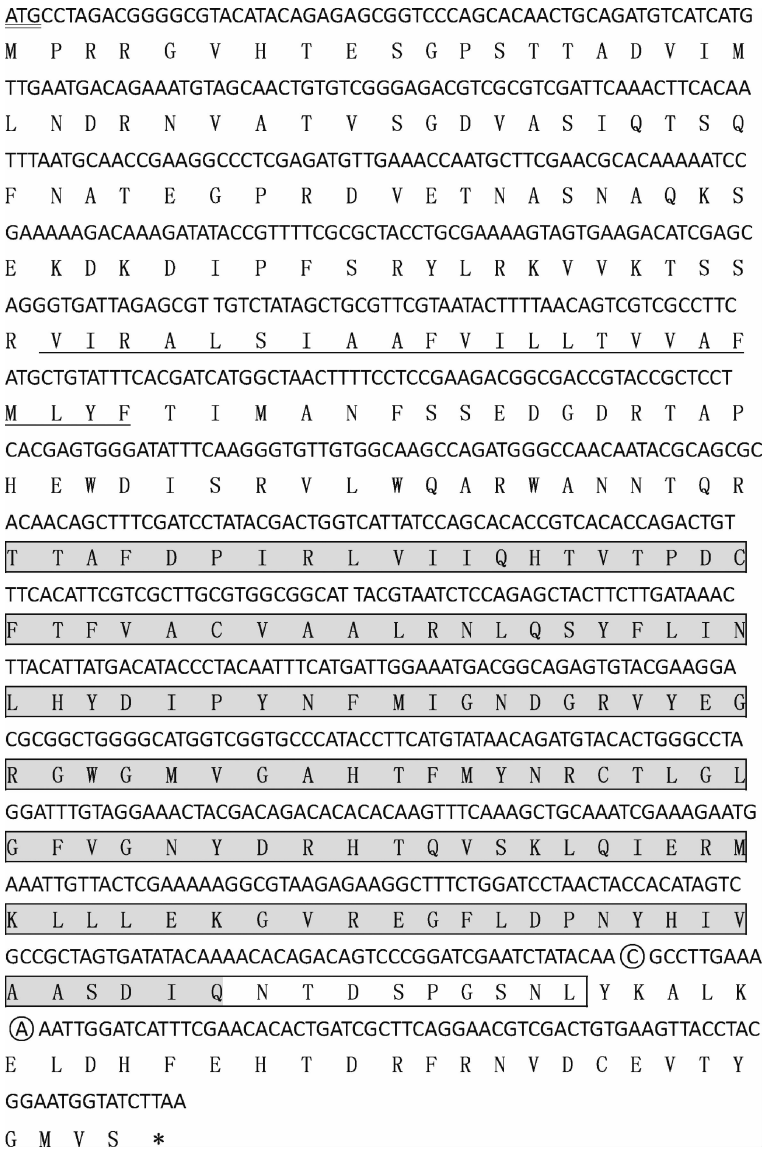


图 1 BmPGRP-L1 编码的核酸与氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and the deduced amino acid sequences of the encoding region of BmPGRP-L1
下划线是跨膜区域, 灰色的是肽聚糖识别蛋白结构域, 方框内的是 Ami_2 结构域, 星号代表终止密码子, 双划线是起始密码子。与家蚕基因组数据库比对, 有两个碱基不一样, 用圆圈标注。The transmembrane region is underlined, the peptidoglycan recognition protein domain is in gray, the Ami_2 domain is boxed, the star represents the stop codon, and the initiation codon is double underlined. There are two bases which are different between the result of the clone and the draft sequence of the Bombyx genome, which are indicated by circle.

克隆的 BmPGRP-L1 的序列与家蚕基因组相应的序列发现总共有 2 个碱基不同, 分别是第 831 和 841 位碱基分别由 G 突变为 C 和 A, 前者由赖氨酸突变为天冬酰胺, 后者改变后还是编码赖氨酸, 氨基酸种类并没有发生改变, 如图 1 所示。

2.2 BmPGRP-L1 的系统进化特征

BmPGRP-L1 与黑腹果蝇 PGRPs 构建的系统进化树如图 2 所示。从图中我们发现 BmPGRP-L1 与 DmPGRP-LC 的相似度较高。图中构建进化树所用到的蛋白序列及其基因的 GenBank 登录号如下:

DmPGRP-SA (AAF48056. 1), DmPGRP-SB1 (CAD89138. 1), DmPGRP-SB2 (CAD89150. 1), DmPGRP-SC1A (CAD89163. 1), DmPGRP-SC1B (CAD89174. 1), DmPGRP-SC2 (CAD89187. 1), DmPGRP-SD (CAD89193. 1), DmPGRP-LB (AFH06372. 1), DmPGRP-LC (AFH04364. 1), DmPGRP-LE (AAG32064. 1) 和 BTL-LP2 (BAB33295.1)。

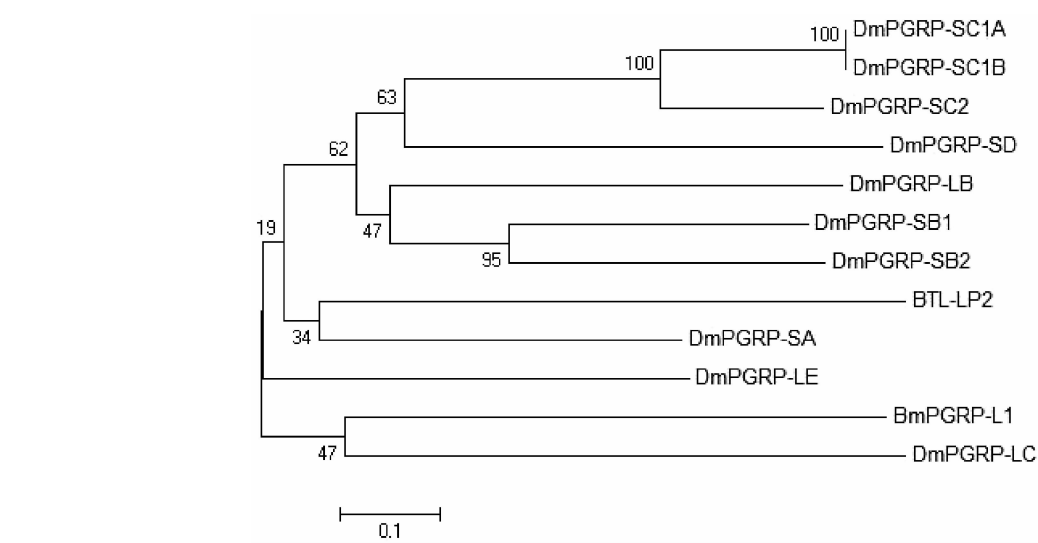


图2 BmPGRP-L1 与黑腹果蝇 PGRP 的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of BmPGRP-L1 with peptidoglycan recognition proteins from *Drosophila melanogaster* 依据 Mega 5.1 的 ClustalW 的多序列比对,运用邻接算法 (NJ) 构建的系统进化树,分支上的数字代表引导百分比。拓扑结构是用引导分析 (500 次重复) 检测的。The tree is constructed by the neighbor-joining (NJ) algorithm using the Mega 5.1 based on the multiple sequence alignment by ClustalW. The numbers above the branch represent bootstrap percentages. The topology was tested using bootstrap analyses (500 replicates).

2.3 BmPGRP-L1 的微生物诱导

微生物注射后家蚕幼虫体壁和头中 BmPGRP-L1 基因的转录表达谱如图 3 所示。相对于注射 PBS 的对照组,注射大肠杆菌的实验组 BmPGRP-L1

基因表达明显升高;而注射酿酒酵母或枯草芽孢杆菌后,BmPGRP-L1 基因表达没有明显变化。这表明 BmPGRP-L1 基因参与家蚕的微生物诱导反应。

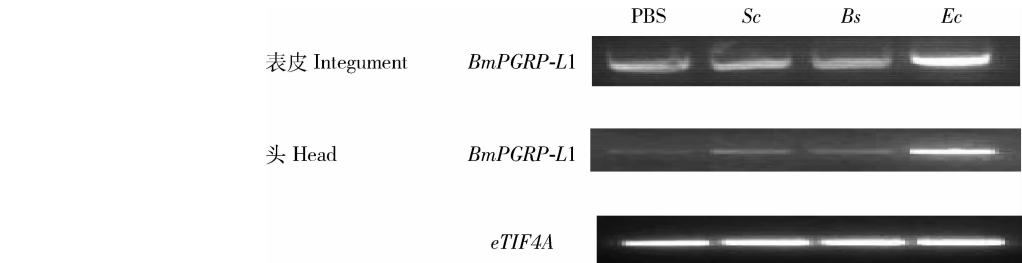


图3 微生物注射家蚕幼虫后 BmPGRP-L1 的免疫应答

Fig. 3 Immune responses of BmPGRP-L1 to microbial infection in Bombyx mori larvae 5 龄起蚕分别注射 PBS、酿酒酵母 (Sc)、枯草芽孢杆菌 (Bs) 和大肠杆菌 (Ec) 12 h 后,RT-PCR 检测 BmPGRP-L1 基因的表达量,eTIF4A 是内参。The relative expression level of BmPGRP-L1 was determined by RT-PCR 12 h after injection of PBS, Saccharomyces cerevisiae (Sc), Bacillus subtilis (Bs) and Escherichia coli (Ec) into the newly-exuviated 5th instar larvae, respectively, and eTIF4A was used as an internal control gene.

2.4 BmPGRP-L1 的 RNAi

为了探究基因 BmPGRP-L1 在家蚕的体壁和头参与何种信号途径,我们将该基因进行 RNA 干扰,看是否能影响一些免疫相关因子及其抗菌肽基因的表达。我们给 5 龄起蚕注射双链 BmPGRP-L1 RNA,

图 4 (A) 显示在体壁中,注射 PBS 和大肠杆菌的对照组明显比注射 dsRNA 和大肠杆菌的实验组中 Relish 因子转录活性要高,而注射酿酒酵母 (图 4: B) 和枯草芽孢杆菌 (图 4: C) 的实验组与对照组 Relish 因子转录活性基本上一样;图 5 显示在家蚕的

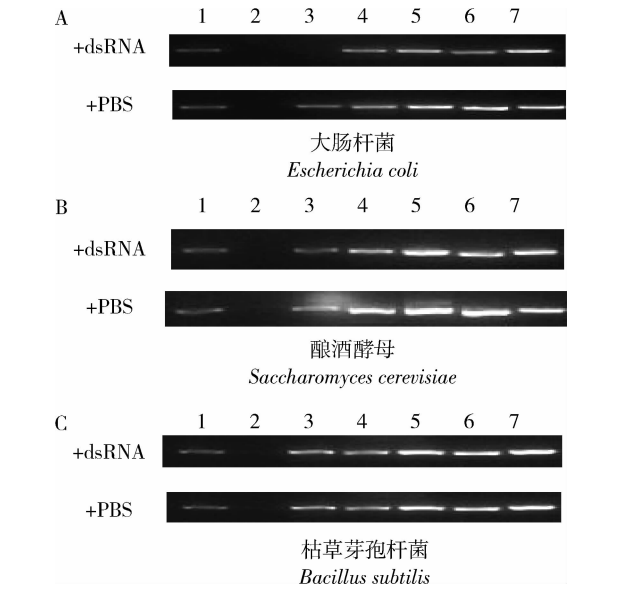


图 4 注射 *BmPGRP-L1* dsRNA 或 PBS 和微生物后家蚕幼虫体壁相关免疫基因的表达

Fig. 4 Expression level of immune related genes in the integument of *Bombyx mori* larvae after injection of *BmPGRP-L1* dsRNA or PBS and then challenged by microorganism as indicated

A: 大肠杆菌 *E. coli*; B: 酿酒酵母 *S. cerevisiae*; C: 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*. 1: *Rel*; 2: *Cactus*; 3: *Relish*; 4: 攻击素基因 *Attacin*; 5: *Moricin*; 6: 葛佬素基因 *Gloverin*; 7: 真核翻译起始因子 4A 基因 Eukaryotic translation initiation factor 4A gene (*eTIF4A*). 对 5 龄起蚕分别注射 *BmPGRP-L1* dsRNA 和 PBS (CK), 6 h 后再分别注射大肠杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和 PBS, 6 h 后收集组织, 用于检测基因表达水平。Newly-exuviated 5th instar larvae were injected with dsRNA specific for *PGRP-L1* or phosphate buffered saline, 6 h later were then injected with *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* and PBS respectively, another 6 h later, tissues were collected and used to detect the transcription levels of the immune related genes.

头部其结果与体壁基本一致。在体壁中没有检测到 *Cactus* 因子, 而 *Rel* 因子实验组和对照组基本上一样; 在头中 *Cactus* 和 *Rel* 因子都没有被检测到。从上述结果中可以看出在体壁和头中, *BmPGRP-L1* 基因参与 Imd 途径。

3 讨论

本研究结果表明, *BmPGRP-L1* 在家蚕的先天免疫中起着重要的作用: 不同种类的微生物可区别性地诱导 *BmPGRP-L1* 基因的转录表达, 即大肠杆菌注射可诱导 *BmPGRP-L1* 的转录表达, 但真菌或枯草芽孢杆菌却不能, 说明家蚕宿主的 *PGRP-L1* 基因可特异性识别入侵的微生物——革兰氏阴性菌大肠杆菌并激活本身的转录水平。 *BmPGRP-L1* 的 RNA

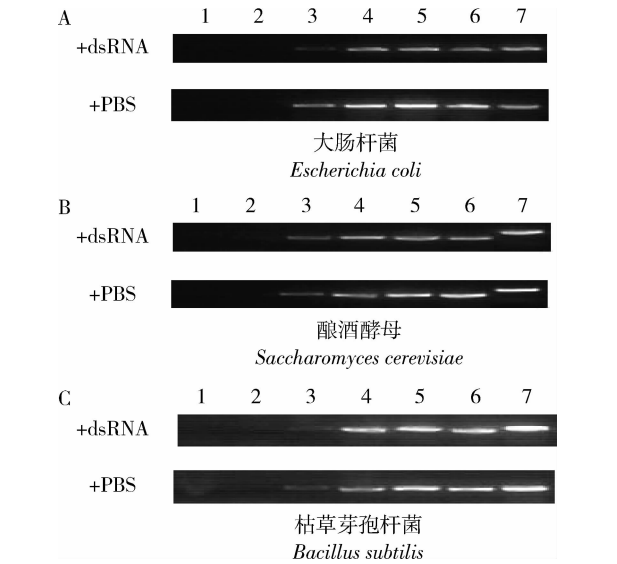


图 5 注射 *BmPGRP-L1* dsRNA 或 PBS 和微生物后家蚕幼虫头部相关免疫基因的表达

Fig. 5 Expression level of the immune related genes in the head of *Bombyx mori* larvae after injection of *BmPGRP-L1* dsRNA or PBS and then challenged by microorganism as indicated

A: 大肠杆菌 *E. coli*; B: 酿酒酵母 *S. cerevisiae*; C: 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*. 1: *Rel*; 2: *Cactus*; 3: *Relish*; 4: 攻击素基因 *Attacin*; 5: *Moricin*; 6: 葛佬素基因 *Gloverin*; 7: 真核翻译起始因子 4A 基因 Eukaryotic translation initiation factor 4A gene (*eTIF4A*). 对 5 龄起蚕分别注射 *BmPGRP-L1* dsRNA 和 PBS, 6 h 后再分别注射大肠杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和 PBS, 6 h 后收集组织, 用于检测基因表达水平。Newly-exuviated 5th instar larvae were injected with dsRNA specific for *PGRP-L1* or phosphate buffered saline, 6 h later were then injected with *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* and PBS, respectively, and another 6 h later, tissues were collected and used to detect the transcription levels of the immune related genes.

干涉实验则表明 *BmPGRP-L1* 基因在家蚕的体壁和头中通过 Imd 信号通路激活抗菌肽的表达。

在果蝇中, *PGRP-SA* 被认为主要参与 Toll 信号通路。 *PGRP-SA* 主要存于在血淋巴中, 能与大多数革兰氏阳性菌赖氨酸型肽聚糖结合, 从而激活一系列的蛋白级联反应, 在脂肪体中通过 Toll 途径诱导抗菌肽基因的转录表达 (Michel *et al.*, 2001; Bischoff *et al.*, 2004; Charroux *et al.*, 2009)。而在本研究中, 在家蚕注射革兰氏阴性菌大肠杆菌后, 家蚕体壁和头中 *BmPGRP-L1* 基因的转录表达显著上调, RNA 干涉实验认为它通过 Imd 途径诱导抗菌肽的表达。说明家蚕 *PGRP-L1* 与果蝇 *PGRP-SA* 的作用机理是不同的。

Tanaka 等 (2008) 认为 *BmPGRP-S2* 在家蚕脂肪体中的表达能被大肠杆菌 (革兰氏阴性菌) 强烈地

诱导但却不能被金黄色酿脓葡萄球菌(革兰氏阳性菌)诱导。杨杰等(2015)认为 *BmPGRP-S2* 在家蚕体壁中的表达能被大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和枯草芽孢杆菌(革兰氏阳性菌)诱导。而在本研究中, *BmPGRP-L1* 在体壁和头中的表达被大肠杆菌诱导,而注射酿酒酵母和枯草芽孢杆菌却没有明显变化。这些结果表明,在注射大肠杆菌后,不同的家蚕肽聚糖识别蛋白基因在家蚕的脂肪体、体壁以及头中出现类似的诱导情况。

在果蝇中, Rel/NF- κ B 蛋白 Relish 是 Imd 通路中的因子, 主要由革兰氏阴性菌激活 (Dushay *et al.*, 1996; Hedengren *et al.*, 1999)。有些家蚕的抗菌肽基因, 如 *Attacin* (Sugiyama *et al.*, 1995) 和 *Moricin* (Furukawa *et al.*, 1999) 已被鉴定。这些基因在 5' 上游区域含有保守的 κ B 元件, 通过电泳迁移率变动分析实验发现 κ B 元件能与核因子结合 (Taniai *et al.*, 1995), 表明 Rel/NF- κ B 的同系物也能调控家蚕抗菌肽基因的表达。另外, Furukawa 等(2009)认为 *BmCactus* 参与家蚕 Toll 信号转导途径。而本研究中注射 PBS + 大肠杆菌的对照组体壁和头中的 *Relish* 明显比注射 dsRNA + 大肠杆菌转录活性要高。而且在家蚕体壁中并未检测到 *Cactus*, 在头中 *Cactus* 和 *Rel* 都没有被检测到。这表明 *BmPGRP-L1* 基因的确是参与 Imd 信号转导途径的激活并且能影响家蚕相关抗菌肽基因的表达。Davis 和 Engstrom (2012)认为在果蝇中 Imd 途径是幼虫表皮抗菌肽表达所必须的, 同样在本研究中, *BmPGRP-L1* 被证明也能够调控抗菌肽的表达及其参与 Imd 信号通路的激活。

Chen 等(2014)认为家蚕 *PGRP-S5* 作为肽聚糖的受体, 可以激活酚氧化酶原级联反应, 并且推测它可作为一种抗菌蛋白。在本研究中 *BmPGRP-L1* 可能也是作为肽聚糖的受体从而激活家蚕体壁和头中的 Imd 途径, 这需要我们进一步的验证。在本研究中, 我们克隆了家蚕的 *BmPGRP-L1* 的基因; 通过微生物大肠杆菌注射家蚕后, 该基因在家蚕的体壁和头中的转录水平明显上升; RNA 干涉分析表明 *BmPGRP-L1* 在家蚕的头和体壁中参与 Imd 信号转导通路的激活。这些结果表明 *BmPGRP-L1* 在家蚕的先天免疫中起着重要的作用。

参考文献 (References)

- Anselme C, Vallier A, Balmand S, Fauvarque MO, Heddi A, 2006. Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(10): 6766–6772.
- Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J, 2004. Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.*, 5(11): 1175–1180.
- Charroux B, Rival T, Narbonne-Reveau K, Royet J, 2009. Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect.*, 11: 631–636.
- Chen KK, Liu C, He Y, Jiang HB, Lu ZQ, 2014. A short-type peptidoglycan recognition protein from the silkworm: expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.*, 45: 1–9.
- Davis MM, Engstrom Y, 2012. Immune response in the barrier epithelia: lessons from the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Innate Immun.*, 4: 273–283.
- Dushay MS, Asling B, Hultmark D, 1996. Origins of immunity: *Relish*, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10343–10347.
- Dziarski R, Gupta D, 2006. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.*, 7: 232.
- Furukawa S, Tanaka H, Ishibashi J, Imanishi S, Yamakawa M, 2009. Functional characterization of a cactus homolog from the silkworm *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(12): 2665–2670.
- Furukawa S, Tanaka H, Nakazawa H, Ishibashi J, Shono T, Yamakawa M, 1999. Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm (*Bombyx mori*). *Biochem. J.*, 340: 265–271.
- Gao K, Deng XY, Qian HY, Qin GX, Hou CX, Guo XJ, 2014. Cloning and expression analysis of a peptidoglycan recognition protein in silkworm related to virus infection. *Gene*, 552: 24–31.
- Gelius E, Persson C, Karlsson J, Steiner H, 2003. A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306: 988–994.
- Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J, 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416: 640–644.
- Guan R, Malchiodi EL, Wang Q, Schuck P, Mariuzza RA, 2004. Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein I α . *J. Biol. Chem.*, 279(30): 31873–31882.
- Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D, 1999. *Relish*, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 4: 827–837.
- Hoffmann JA, 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33–38.
- Kim MS, Byun M, Oh BH, 2003. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Immunol.*, 4(8): 787–793.
- Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697–743.

- Leone P, Bischoff V, Kellenberger C, Hetru C, Royet J, Roussel A, 2008. Crystal structure of *Drosophila* PGRP-SD suggests binding to DAP-type but not lysine-type peptidoglycan. *Mol. Immunol.*, 45: 2521 – 2530.
- Maillet F, Bischoff V, Vignal C, Hoffmann J, Royet J, 2008. The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell Host & Microbe*, 3: 293 – 303.
- Mellroth P, Karlsson J, Steiner H, 2003. A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.*, 278 (9): 7059 – 7064.
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J, 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414: 756 – 759.
- Ochiai M, Ashida M, 1999. A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 274(17): 11854 – 11858.
- Steiner H, 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol. Rev.*, 198: 83 – 96.
- Sugiyama M, Kuniyoshi H, Kotani E, Taniai K, Kadono-Okuda K, Kato Y, Yamamoto M, Shimabukuro M, Chowdhury S, Xu J, 1995. Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(3): 385 – 392.
- Takeda K, Akira S, 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 17(1): 1 – 14.
- Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuki N, Yoshiyama M, Kaneko Y, Iwasaki T, Sunagawa T, Yamaji K, Asaoka A, Mita K, Yamakawa, 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1087 – 1110.
- Taniai K, Kadono-Okuda K, Kato Y, Yamamoto M, Shimabukuro M, Chowdhury S, Xu J, Kotani E, Tomino S, Yamakawa M, 1995. Structure of two cecropin B-encoding genes and bacteria-inducible DNA-binding proteins which bind to the 5'-upstream regulatory region in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 163: 215 – 219.
- The International Silkworm Genome C, 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1036 – 1045.
- Wang ZM, Li X, Cocklin RR, Wang M, Wang M, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Gupta D, Dziarski R, 2003. Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.*, 278(49): 49044 – 49052.
- Werner T, Liu G, Kang DW, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25): 13772 – 13777.
- Yang J, Wang XN, Tang SM, Shen ZY, Wu JM, 2015. Peptidoglycan recognition protein S2 from silkworm integument: characterization, microbe-induced expression, and involvement in the immune-deficiency pathway. *J. Insect Sci.*, 15(20): DOI: 10.1093/jisesa/iev007.
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M, 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 271(23): 13854 – 13860.

(责任编辑: 袁德成)